中草藥一般毒性評估模式探討

彭文煌[1]、李宜璇[1]、蔡金川[2]、張淑貞[3]、賴銘淙[4]、謝明村[1]

[1] 中國醫藥大學中國藥學研究所

[2] 義守大學生物科技學系

[3] 中國醫藥大學藥學系

[4] 彰濱秀傳紀念醫院病理科

（ 97 年 09 月 03 日受理，97 年 10 月 22 日接受刊載 ）

本研究以四種等倍劑量常用八種藥材（黑順片、薑半夏、法半夏、川大黃、酒大黃、青蒿、旋覆花、射干）水萃取物口服給予小鼠，觀察小鼠之死亡隻數及死亡情形，再以Litchfield & Wilcoxon方法求其50% 致死劑量；其次再以臨床一般用量及五倍用量每天給予小鼠中藥材萃取物一次，連續給予28天，觀察其28天之亞急性毒性，以探討常用六味藥材是否具有口服急性毒性及口服給藥28天之亞急性毒性。並進行對沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）TA98、TA100及TA1535菌株致突變性之Ames試驗及對HepG2、MDCK、NRK-52E三種肝、腎細胞株的細胞毒性試驗（MTT test）。

結果顯示，採樣自台灣北中南三家大盤中藥代理商之常用八種藥材中黑順片之小鼠口服LD_{50}劑量分別為10.6 g/kg、11.9 g/kg及9.8 g/kg，其餘藥材之小鼠口服LD_{50}劑量均大於10.0 g/kg仍未見死亡。並將此八種藥材以一般常用劑量口服給與小鼠，每天給藥一次，連續給28天後並未見有小鼠死亡、sGOT、sGPT、BUN、creatinine值及體重顯著變化；給予五倍常用劑量射干及法半夏小鼠之sGOT增加，給予五倍常用劑量射干小鼠之sGPT增加，肝組織中央靜脈區有充血，細胞脹大及變性現象，給予五倍常用劑量薑半夏及法半夏小鼠之BUN值增加，給予五倍常用劑量青蒿及法半夏小鼠之creatinine值增加，腎組織有充血，細胞腫脹變性及髓質出血現象。大黃、旋覆花、青蒿的水萃物在最高濃度（1 mg/ml）對HepG2造成細胞毒性，旋覆花在最高濃度（1 mg/ml）對MDCK造成細胞毒性，青蒿、大黃、射干、旋覆花在最高濃度（1 mg/ml）對NRK-52E造成細胞毒性。

綜合以上結果顯示薑半夏、法半夏、川大黃、酒大黃、青蒿、旋覆花、射干等之小鼠口服急性毒性甚低，此八種藥材在一般劑量下並未見有亞急性毒性。附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干六味藥材之水萃取物對沙門菌回復突變之Ames試驗並不具有致突變性，但大黃、青蒿、旋覆花、射干會造成HepG2，MDCK，NRK-52E細胞毒性，可能與細胞株的敏感性有關。

關鍵詞：中草藥、肝毒性、腎毒性

聯絡人 ： 彭文煌，404 台中市北區學士路 91 號，中國醫藥大學中國藥學研究所，電話 ：04-22053366 分機 5505
傳真號碼 ：04-24075683，電子郵件信箱 ： whpeng@mail.cmu.edu.tw

前　言

本研究目標為協助衛生署中醫藥委員會，逐步建立國內中草藥更安全的使用環境，保障國民健康，形成一個有關中藥安全資料的技術平台，讓中藥的安全性，不再停留於古籍的記載上，而有更好的實證醫學證據。對於國內中草藥健康產業的發展與外銷推展，將形成一個「中草藥安全性」把關的重要基石。2003年全國衛生醫療政策會議總結報告書[1]中指出，醫療首要前題為病人安全，為減少醫療錯誤的發生，提供全國民眾安全就醫環境，建構病人安全資訊體系及用藥安全機制，為重要之行動綱領。

在台灣一般民眾認為中藥無毒性、無副作用，因此常有誤食而中毒之情況發生。最近大陸有許多篇中藥不良反應之綜述報導[2-14]，而比利時也曾有民眾服用含中草藥之減肥藥而導致腎衰竭之中毒報告[15-17]，顯示部份中草藥也有毒性，可能引起中毒或不良反應[18-24]，過去曾有民眾因服用杏仁、八角蓮、雷公藤[25]、蔓陀羅等中草藥而引起中毒之報告。

近年來中藥中毒事件頻傳，經過比利時腎衰竭事件後，馬兜鈴酸引起慢性腎衰竭中毒引起廣泛地討論及研究，並此病稱為中草藥腎病（Chinese herbs nephropathy, CHN）[15,16]，引起人們對中草藥會引起腎病的疑慮。2000年6月9日，美國藥品與食品管理局（FDA），更命令停止進口、製造和銷售已知含有和懷疑含有馬兜鈴酸的原料和成品，引起世界各地對中草藥安全性之質疑。

因為肝臟是人體代謝中樞，幾乎所有的藥物或化學物質都會經由肝臟生物轉換後排泄出人體，在生物轉換過程中有可能造成肝臟傷害；根據文獻報告約有2-5%黃疸病患是因藥物引起，肝炎住院病患中10%也是因藥物造成的，猛暴性肝炎更高達25%。這些數據顯示在藥物種類急遽增加的今日，藥物引起肝臟傷害的重要性也與日俱增[26-31]。藥物一般皆經由肝臟代謝，因此中藥也可能引起藥物性肝損害或藥物性肝炎。

中藥引起肝損害的因素包括：(1)人們對中藥的潛在肝毒性認識不足；(2)劑量過大或療程過長；(3)炮製、用法與配伍；(4)傳統偏方、驗方在流傳過程中已喪失其原貌，導至用法、用量和組方不當；(5)中藥材的誤用或混用；(6)中西藥不當的併用，產生交互作用，引起不良反應；(7)個體差異等。

有些中草藥具有肝腎毒性，使用不當或體質特異者可能造成肝損傷。雖然疑似服用中草藥而導致肝傷害的個案時有所聞[15-19]；但由於中毒性肝炎的診斷困難，能被確立者並不多見。

因神農本草經下品藥記載多毒，不可久服，故本研究擬以本校附設醫院中藥局常用的下品藥挑選出常用六味藥材品項如下：附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干。將常用八種藥材（黑順片、薑半夏、法半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干）之水萃取物之LD_{50}急性毒性及口服給藥28天之肝腎毒性，進行肝腎毒理探討。本研究成果可提供給臨床醫師及中藥管理者作為用藥參考。本研究擬釐清中藥與肝/腎毒藥理相關機制，強化其實證基礎，規劃將研究成果匯集成資料庫，以利未來進行pharmacovigilance/ post market surveillance，並提供衛生署中醫藥委員會政策推動方向，促進國人用藥安全。成果可以提供醫療保健藥品開發時藥物選擇及藥物用量之參考。

材料與方法

一、中草藥肝與腎毒性之動物評估研究

本研究使用六種中藥材之八種市售炮製品分別購自台灣北中南三大中藥進口商，分別取上述藥材一公斤，打碎後置於10公升燒瓶中並加三公升蒸餾水於50℃回流萃取八小時，共計萃取四

次，分別過濾後再以冷凍乾燥法乾燥，分別得到八種市售炮製品之萃取物。

1. LD_{50} 急性毒性試驗

每個萃取物取四至五個劑量（等倍級數），每個劑量10隻雄性小鼠，分別口服給藥後觀察中毒症狀並紀錄死亡數，以回歸分析及開平方法求出每個藥材之LD_{50}劑量[32]，再依此劑量來找尋其慢性毒性實驗所需的劑量。

2. 28天慢性毒性試驗

每個萃取物取以臨床常用量及五倍量，每組10隻雄性小鼠，測試試驗物質經由重覆持續餵飼28天後對哺乳動物之潛在毒性，得知試驗物質之作用器官及毒性變化。檢測項目包括：血清生化檢查、尿液學檢查、肉眼及肝、腎病理觀察等[33]。

全部實驗小鼠都在給藥28天期間死亡老鼠或第28天存活小鼠，以心臟採血方式檢測肝、腎臟的生化功能：BUN、Cr、albumin、MDA、serum creactinine（Scr）、SOD、GOT（AST）、GPT（ALT）、TG、Cholesterol。並取肝腎組織做切片染色判讀分析。其中GOT（AST）及GPT（ALT）檢測原理是依據Reitman & Frankel（1957）[34]的標準方法。

3. 肝、腎組織病理學的觀察

在實驗結束時，所有小鼠均予以犧牲，頸動脈採血後用於生化指數的檢測，最後再割取肝、腎臟。採取肝腎細胞，放入10%的中性福馬林中固定，做進一步的病理染色。為了觀察肝腎細胞的受損等變化，因此將肝腎組織做HE染色法，此法的染色結果能長久保存，為黑白照片的最佳選擇，便於觀察肝腎組織的變化程度，此部分由賴銘淙博士執行染色及判讀等實驗工作。

二、中草藥肝與腎毒性之細胞評估研究

㈠實驗材料

1. 供試菌株：

⑴細菌致突變性[35-41]：*Salmonella typhimurium* TA98、 TA100及T1535 三種菌株原購自日本醱酵研究所（Institute for Fermentation, Osaka 17-85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan）。

⑵細胞毒性試驗（MTT test）[41]：HepG2、MDCK、NRK-52E原購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

2. 培養基配製

⑴液體營養培養基(Nutrient broth, NB)：細菌之液體培養基。

稱取8g Difico® bacto nutrient broth（BD, USA）及5 NaCl配製1000 ml，以121℃、15分鐘，高溫高壓滅菌，放入4℃保存。

⑵固體全營養培養基(Nutrient agar plate, NA)：細菌之固體培養基。

稱取15 g Difico® Agar（BD, USA）溶於1000 ml NB營養液，以121℃、15分鐘，高溫高壓滅菌。趁熱分裝至無菌培養皿（20 ml/plate），室溫下凝固後倒置，放入37℃烘乾，放入4℃保存。

⑶50X Volgel-Bonner Salts儲存液：配製細菌之最低營養需求用。

以670 ml 逆滲透水加熱至45℃，依序加入10g $MgSO_4.7H_2O$、100 g Citric acid, monohydrate, 500 g K_2HPO_4及175 g $NaHNH_4PO_4.4H_2O$，定量至1000 ml。

以121℃、15分鐘，高溫高壓滅菌，回溫後放入4℃保存。

⑷固體最低營養需求培養基（Minimal glucose agar plate, MA）：致突變試驗

用。

取15 g Agar 加入930 ml 逆滲透水，以121℃、15分鐘經高溫高壓滅菌。加入20 ml 無菌50x VB salt及50 ml無菌40%葡萄糖混合均勻，待溶液降溫至50℃，加入3.15 ml無菌Ampicillin，倒入10 cm培養皿（20 ml/plate），室溫下凝固後倒置，放入37℃烘乾，放入4℃保存。

⑸軟性瓊脂培養基（Soft agar or Top agar）：致突變性試驗使用。

以0.75% Agar與0.5% NaCl混合均勻，分裝倒入2 ml試管。以121℃、15分鐘經高溫高壓滅菌，放入4℃保存。使用前再加熱溶解，於水浴槽內保持50℃。

⑹肝臟活化酵素之製備

製備方法參考Ames, 1971及Ames et al., 1975，將Aroclor 1254溶於玉米油中配成200 mg/ml之濃度，以500 mg/kg劑量腹腔注射於體重約200 g雄性大鼠（Rattus norvegicus, Spraque-Dawley strain），誘發肝臟活化酵素（microsomal enzymes），5天後犧牲經無菌取肝臟，秤重後加3倍體積冰冷之0.15 M KCl。

將組織剪碎研磨後，於4℃以9000 g離心10分鐘，取上層液為S9肝臟活化酵素抽出液，蛋白質含量經定量後，以無菌水稀釋成40 mg/ml濃度，儲存於 -80℃ 備用。

試驗前新鮮配製S9混合液與測試藥劑反應，每毫升S9混合液內含100 µl S9肝臟酵素抽出液、4 µmole µ-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (sodium salt)、5 µmole glucose-6-phosphate (mono sodium salt)、8 µmole $MgCl_2$、33 µmole KCl及100 µmole sodium phosphate buffer (pH 7.4)。

㈡試驗步驟

⑴細菌毒性測試

測試藥材對細菌的毒性，選擇無細菌毒性濃度，作為Ames test測試的最高濃度。附子、半夏、青蒿、旋覆花、射干最終濃度為0.5、1及5 mg/plate，大黃最終濃度為0.25、0.5及1 mg/plate，以逆滲透水配製測試樣品操作濃度（stock solution），在以0.45 µm濾紙過濾後加至細菌培養中。取於37℃震盪培養箱培養18小時後之菌液，以無菌PBS緩衝液連續10倍稀釋成10^{-6}/ml及10^{-7}/ml。取100 µl藥材，加入菌液100 µl，置於NA plate上，以三角玻棒塗抹均勻，最終濃度為0.5、1、5 mg/plate及對照組。將塗抹均勻之NA培養皿倒置，於37℃震盪培養箱，經隔夜培養後取出計算菌落及記錄。

⑵致突變測試[36, 37]

陽性藥劑對照組：不加肝臟活化酵素直接處理試驗菌株之陽性對照組為1 µg/plate 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) (Sigma-Aldrich Co., USA)；經S9活化代謝之陽性對照組為5 µg/plate 2-AA(Sigma-Aldrich Co., USA)。藥劑劑量：0.05、0.01、0.5、1及5 mg/plate等5種，對照組為逆滲透水。取100 µl之藥材樣品操作濃度加入0.2 ml之0.5 mM histidine (Merck, kGaA, Germany) 與0.5 mM biotin (Sigma-Aldrich Co., USA) 混合液及100 µl菌液，加肝臟活化酵素處理者，另加100 µl S9混合液，再混入45℃ 之2 ml 0.75 % 軟性瓊脂內含0.5 % NaCl，混合後倒入MA培養皿待室溫凝固後，倒置於37℃培養箱中培養48小時。計算培養皿之回復突變菌落數，各劑量組為3個重覆數。

⑶細胞毒性試驗（MTT test）[42]

前一晚loading細胞株加至96 well plate，濃度為5×104 cells/ml，每一個well loading 100 µl。sample 稀釋：Stock solution濃度為50 mg/ml(10% in DMSO)，先以blank DMEM 25倍稀釋stock solution，濃度為2 mg/ml，再連續10倍稀釋至0.2 mg/ml及0.02 mg/ml。Loading sample：Control group：blank DMEM，100 µl/well。Treatment group：loading 各濃度 100 µl/well，final concentration 為1、0.1 mg/ml。100 µl/well。

於37℃ 5%CO_2 incubator中培養24小時後，倒掉上清液，以PBS洗兩次。加入MTT solution 50 l/well (2 mg/ml in PBS)，培養3小時。3小時後，倒掉上清液。Loading DMSO 50 µl/well，呈色均勻後，以ELISA Reader 550 nm判讀OD值。上述實驗重複三次。

三、數據分析

採用SPSS電腦統計套裝軟體進行配對t-檢定（unpaired student t-test）或單因子變異數分析（One-Way ANOVA），並以Scheffe's multiple range test來檢定不同處理間顯著差異效果，凡P<0.05時則認為有統計意義。

結　果

一、中草藥肝與腎毒性之動物評估研究

1. 三家八種市售神農本草經下品藥中藥材之萃取率

北中南三家大盤商之法半夏、薑半夏、川大黃、酒大黃、青蒿、旋覆花、射干等粗萃取物之萃取率如表1所示，其中以薑半夏之萃取率最低，川大黃之萃取率最高。

表 1　三家八種市售中藥材萃取物之萃取率

藥材名	甲家萃取率 (%)	乙家萃取率 (%)	丙家萃取率 (%)
黑順片	14.60	13.4	15.10
法半夏	8.50	9.40	10.30
薑半夏	3.69	4.92	5.31
川大黃	40.22	39.27	41.35
酒大黃	29.41	27.28	30.63
青蒿	9.22	10.37	11.22
旋覆花	23.06	21.13	24.54
射干	7.61	7.12	8.73

表 2　三家八種市售中藥材萃取物之口服50%急性毒性(LD_{50})

藥材名	LD_{50} (g/kg, p.o.)		
	甲家	乙家	丙家
黑順片	10.6	11.9	9.8
法半夏	>10.0	>10.0	>10.0
薑半夏	>10.0	>10.0	>10.0
川大黃	>10.0	>10.0	>10.0
酒大黃	>10.0	>10.0	>10.0
青蒿	>10.0	>10.0	>10.0
旋覆花	>10.0	>10.0	>10.0
射干	>10.0	>10.0	>10.0

2. 三家八種市售神農本草經下品藥中藥材之口服50%急性毒性

如表2所示，北中南三家大盤商之法半夏、薑半夏、川大黃、酒大黃、青蒿、旋覆花、射干等粗萃取物口服給予10.0 g/kg均未見有中毒死亡的情形，而黑順片（附子）之口服50%急性毒性劑量分別為10.6 g/kg、11.9 g/kg及9.8 g/kg。

3. 三家八種市售神農本草經下品藥中藥材之口服28天餵食毒性

八種藥材以一般常用劑量及五倍常用劑量口

服給與小鼠，每天給藥一次，連續給28天後並未見有小鼠死亡及體重顯著變化，唯給予五倍常用劑量射干及法半夏小鼠之sGOT增加（如圖一所示），給予五倍常用劑量射干小鼠之sGPT增加（如圖二所示），肝組織中央靜脈區有充血，細胞脹大及變性現象，給予五倍常用劑量薑半夏及法半夏小鼠之BUN值增加（如圖三所示），給予五倍常用劑量青蒿及法半夏小鼠之creatinine值增加（如圖四所示），腎組織有充血，細胞腫脹變性及髓質出血現象，肝腎功能生化值顯示此八種藥材在一般劑量下並未見有亞急性毒性，給予五倍常用劑量法半夏肝腎毒性，射干有肝毒性，薑半夏及青蒿則有腎毒性。

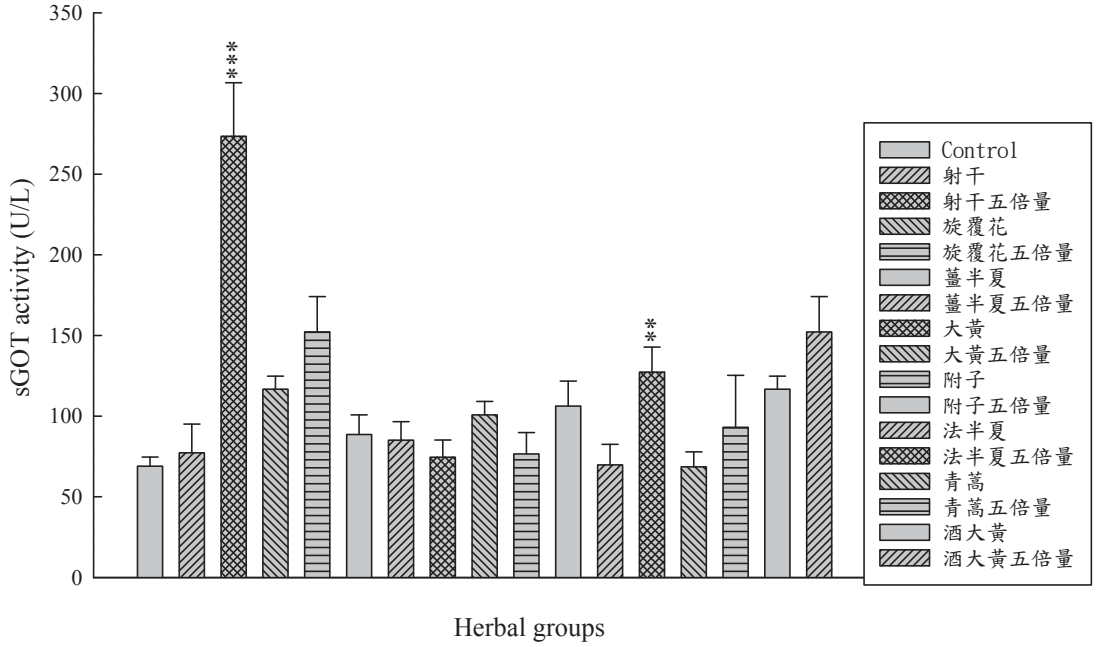
二、中草藥肝與腎毒性之細胞評估研究

1. 分析各劑量組與細菌回復突變數增加之相關性

不論測試樣品是否經肝臟酵素（S9）活化處理，有2個以上劑量組之細菌回復突變數，高於無藥劑對照組2倍以上者，或各劑量組與回復突變數有顯著之線性相關者，可判定該供試樣品之致變異性結果為陽性反應。附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干對沙門菌TA98, TA100, TA1535菌株回復突變之Ames試驗並不具有致突變性，對沙門菌TA98, TA100, TA1535菌株基因突變測試（gene mutation in bacteria）結果亦為陰性反應。

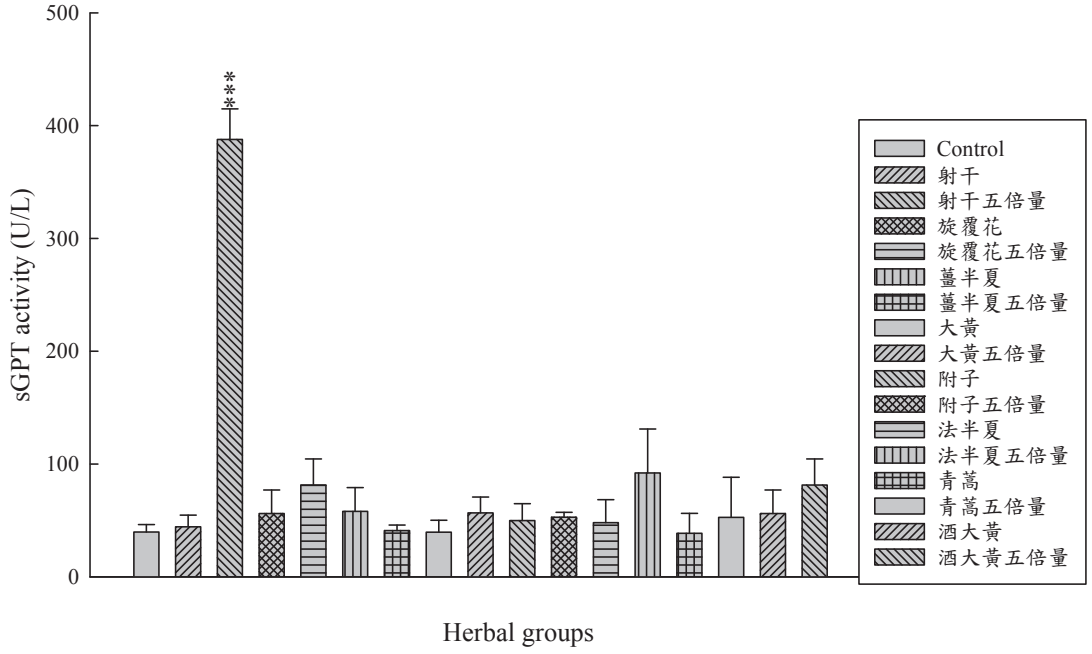
2. 細胞毒性試驗（MTT test）

圖五結果顯示，大黃最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有25%的細胞毒性。射干最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。旋覆花最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有67%的細胞毒性。半夏最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。附子最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。青蒿最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有24%的細胞毒



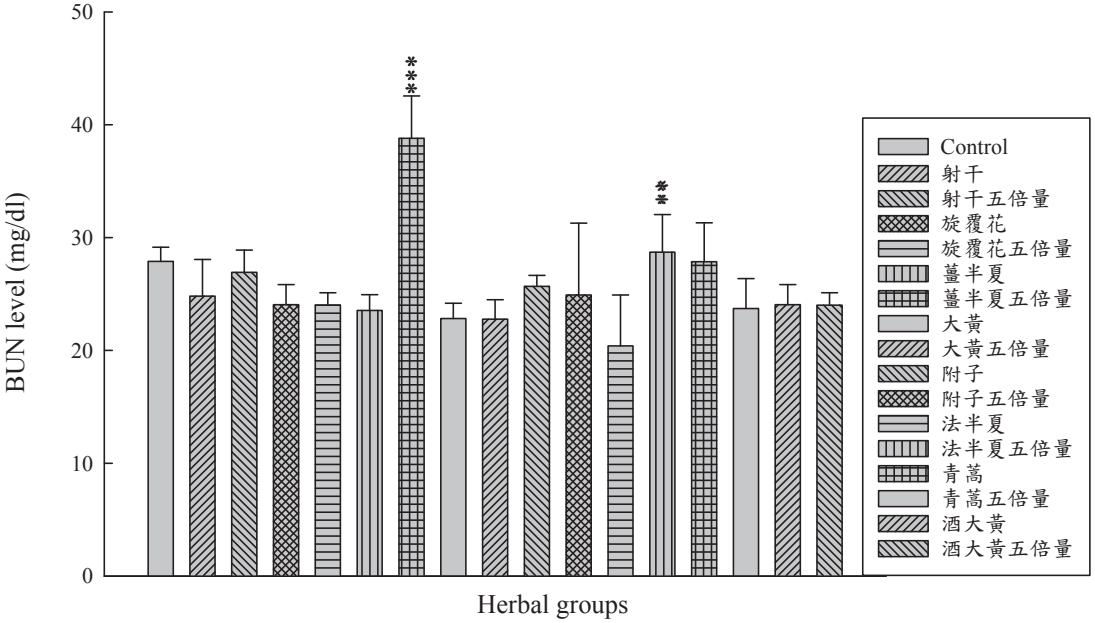
圖一　三家八種市售中藥材萃取物之**sGOT**功能檢測。

Data expressed as mean±SEM (n=10). **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group.



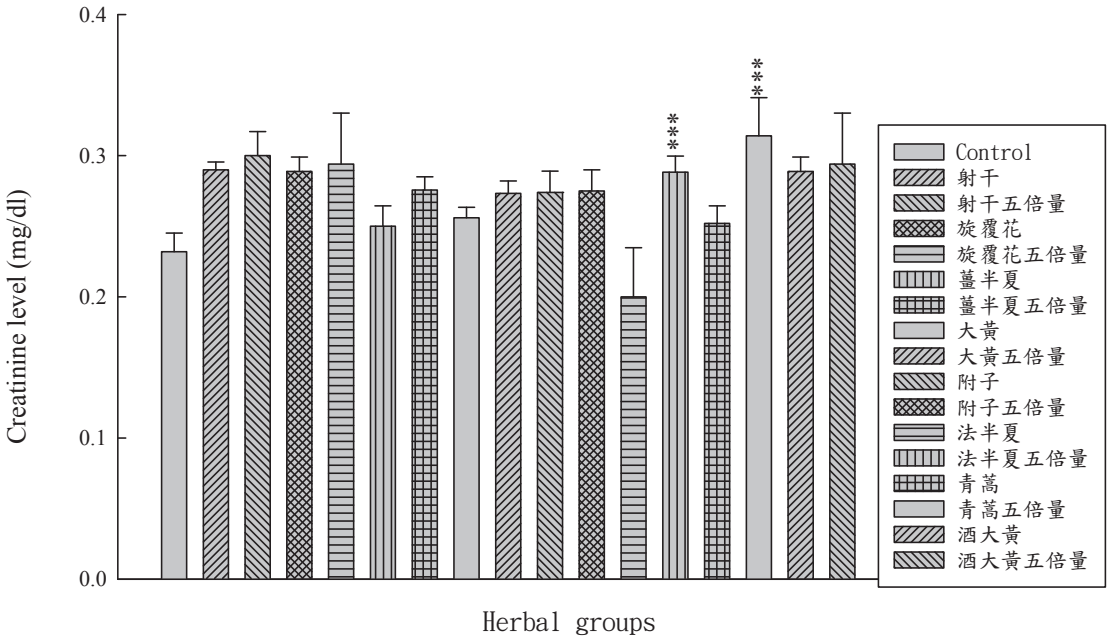
圖二　三家八種市售中藥材萃取物之**sGPT**功能檢測。

Data expressed as mean±SEM (n=10). ***P < 0.001 as compared with the control group.



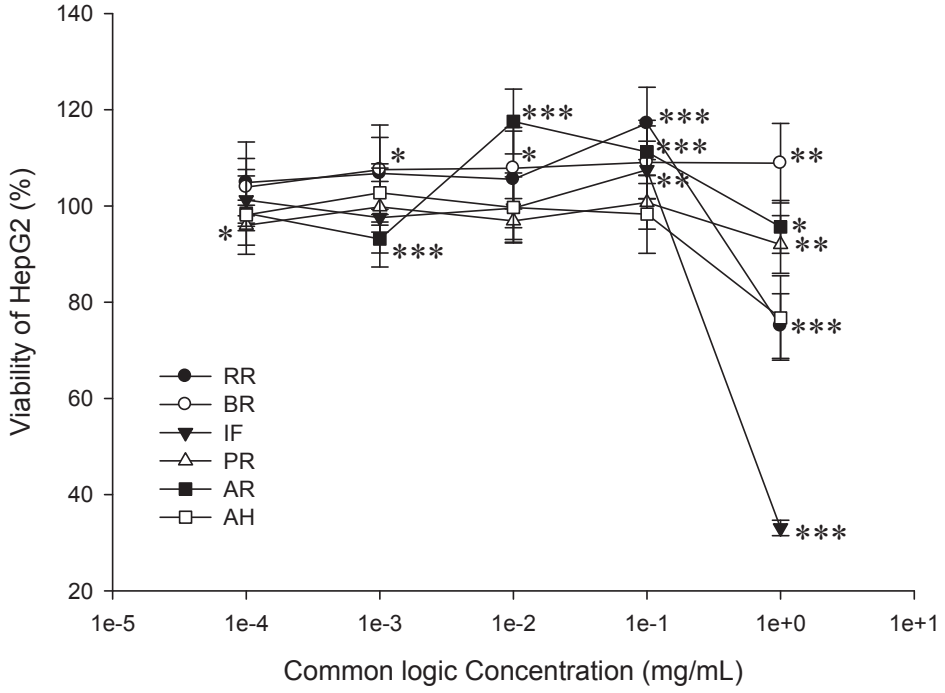
圖三　三家八種市售中藥材萃取物之**BUN**濃度檢測。

Data expressed as mean±SEM (n=10). **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group.



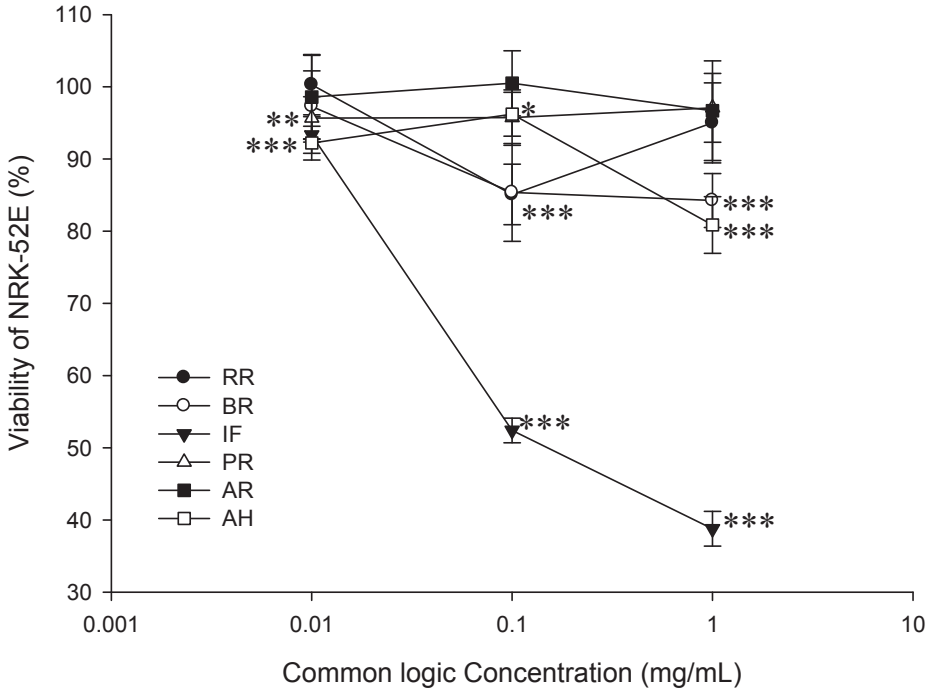
圖四　三家八種市售中藥材萃取物之**creatinine**濃度檢測。

Data expressed as mean±SEM (n=10). ***P < 0.001 as compared with the control group.



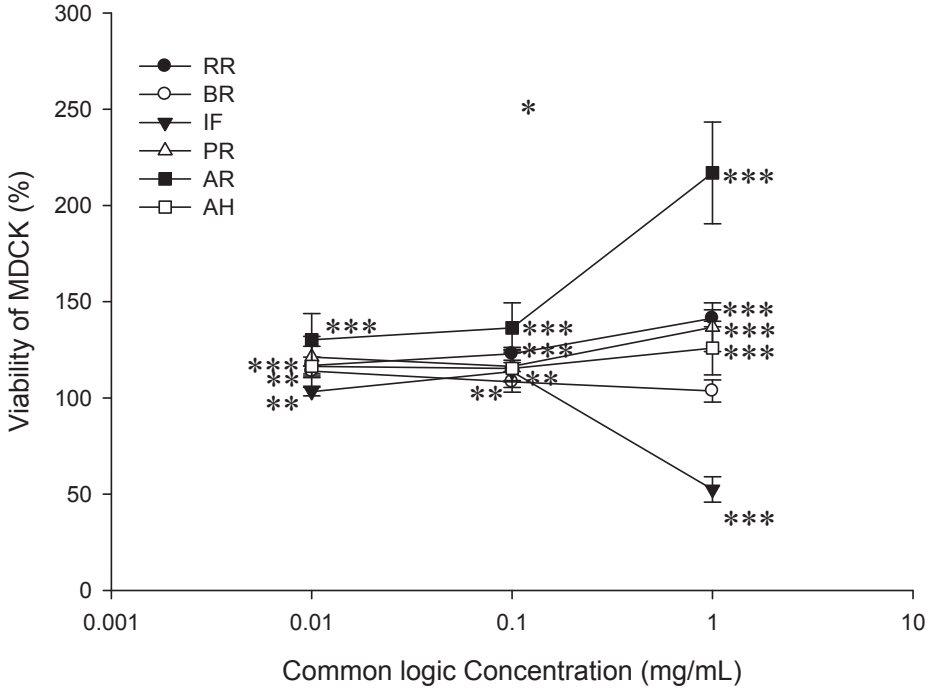
圖五　附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干對**Hep G2**細胞毒性試驗。

Data presented as mean±SD (n=3). AH：青蒿；**AR**：附子；**BR**：射干；**IF**：旋覆花；**PR**：半夏；**RR**：大黃。***P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001** 與對照組 **(100%)**比較（配對**t**-檢定）。



圖六　附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干對**NRK-52E**細胞毒性試驗。

Data presented as mean±SD (n=3). AH：青蒿；**AR**：附子；**BR**：射干；**IF**：旋覆花；**PR**：半夏；**RR**：大黃。***P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001** 與對照組 **(100%)**比較（配對**t-**檢定）。



圖七、附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干對**MDCK**細胞毒性試驗。

Data presented as mean±SD (n=3). AH：青蒿；**AR**：附子；**BR**：射干；**IF**：旋覆花；**PR**：半夏；**RR**：大黃。***P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001** 與對照組 **(100%)**比較（配對**t-**檢定）。

性。

圖六結果顯示，大黃在0.1 mg/ml濃度下約造成15%的NRK-52E細胞毒性，但在1 mg/ml的濃度可使NRK-52E細胞存活率不降反升，判斷應為樣品本身的色素干擾所致。射干在試驗最高濃度（1 mg/ml）約造成20%的NRK-52E細胞毒性。旋覆花在0.1 mg/ml 即可見到顯著性的NRK-52E細胞毒性，且有劑量相關反應（Dose dependent response）。半夏在試驗最高濃度（1 mg/ml）不造成NRK-52E細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成NRK-52E細胞毒性。青蒿在試驗最高濃度（1 mg/ml）約造成20%的NRK-52E細胞毒性。

圖七結果顯示，大黃在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK的細胞毒性。射干在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK的細胞毒性。旋覆花在1 mg/ml 對MDCK造成48%的細胞毒性。半夏在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。

討　論

結果顯示，採樣自台灣北中南三家大盤中藥代理商之常用八種藥材中黑順片之小鼠口服LD_{50}急性毒性劑量分別為10.62 g/kg、11.95 g/kg及9.76 g/kg，其餘藥材之小鼠口服LD_{50}急性毒性劑量均大於10.0 g/kg，顯示此七種藥材之口服LD_{50}急性毒性甚低。

研究發現山大黃海Rheum Rhaponticum）水煎劑對小鼠經口LD_{50} 大於10 g/ kg，因此山大黃經口毒性很小[43]。大黃重複給藥6 個月產生毒性反應的劑量為10 g/(kg·d) ，大黃重複給藥的無明顯毒性反應的劑量為2.5 g/(kg·d) ，對SD大鼠的毒性反應主要靶器官為腎臟，毒性部位為腎小管上皮細胞，肝臟也可能是其主要毒性靶器官之一，此毒性損害是可恢復的[44]。

急性毒性與亞急性毒性試驗表明，半夏炮製品混懸液和生藥煎劑毒性均不明顯，除半夏混懸液組小鼠在用藥期間出現食量減少、體重減輕、以致死亡外，其餘各組與對照組相比，外觀、體重等方面均未見明顯差別，對小鼠的心、肝、脾、腎及腸等臟器的解剖及病理切片，均未見動物毒性所致的病理變化，所以認為加熱或炮製對生半夏有解毒作用[45]。楊守業等亦報導小鼠分別灌胃生半夏混懸液及礬制半夏混懸液，結果礬制半夏組未見毒性反應，對小鼠體重亦無影響；而生半夏各組均顯著地抑制小鼠體重增長，且各組均有死亡，對肝、腎功能雖無明顯影響，但腎指數明顯增高，提示生半夏較長時間給藥後能引起腎臟代償性的增大，生半夏引起中毒的靶器官主要是肝、腸和腎臟，病理學檢查未見明顯病理形態學改變[46]。

附子煎煮液急性毒性實驗未顯示出急毒作用，未能測出LD_{50}[47]。

將此八種藥材以一般常用劑量口服給與小鼠，每天給藥一次，連續給28天後並未見有小鼠死亡及體重顯著變化，顯示此八種藥材在一般劑量下並未見有亞急性毒性。神農本草經下品藥雖記載多毒，不可久服，但只要炮製得宜，去其毒性成分並保留其有效成分，或將有毒成分經炮製後轉變成毒性低或無毒性成分，將可增加神農本草經下品藥之臨床可用率。

綜合對沙門菌TA98, TA100, TA1535菌株回復突變之Ames試驗結果，附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干對沙門菌TA98, TA100, TA1535菌株回復突變之Ames試驗並不具有致變異性，對細菌基因突變測試（gene mutation in bacteria）結果為陰性反應（數據未顯示）。結果顯示不論藥材之水萃取物經直接，或經S9作用後對TA98、TA100及1535之細菌回復突變菌數均無明顯增

加，顯示附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干，六味藥材之水萃取物對沙門菌回復突變之Ames試驗並不具有致變異性，對細菌基因突變測試結果為陰性反應。（數據未顯示）

大黃最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有25%的細胞毒性。射干最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。旋覆花最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有67%的細胞毒性。半夏最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。附子最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株不具有細胞毒性。青蒿最高濃度（1 mg/ml）對HepG2細胞株有24%的細胞毒性。大黃在0.1 mg/ml濃度下約造成15%的NRK-52E細胞毒性，但在1 mg/ml的濃度可見O.D. value上升，使細胞存活率不降反升，判斷應為樣品本身的色素干擾所致。射干在試驗最高高濃度（1 mg/ml）約造成20%的NRK-52E細胞毒性。旋覆花在0.1 mg/ml 即可見到顯著性的NRK-52E細胞毒性，且有劑量相關反應。半夏在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成NRK-52E細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成NRK-52E細胞毒性。青蒿在試驗最高高濃度（1 mg/ml）約造成20%的NRK-52E細胞毒性。大黃在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK的細胞毒性。射干在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK的細胞毒性。旋覆花在1 mg/ml 對MDCK造成48%的細胞毒性。半夏在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。附子在試驗最高高濃度（1 mg/ml）不造成MDCK細胞毒性。以上在肝腎細胞的實驗結果在肝腎毒性的意義不大，僅供參考。

本研究進行常用六味藥材（附子、半夏、大黃、青蒿、旋覆花、射干）之小鼠口服LD_{50}急性毒性及口服給藥28天之肝腎毒性。並進行對沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）TA98、T100及TA1535菌株回復突變致變異性之Ames試驗及進行對HepG2、MDCK、NRK-52E三種細胞株的細胞毒性試驗（MTT test）。獲得如下結論：

1. 神農本草經下品藥雖記載多毒，不可久服。本研究結果發現，只要炮製得宜，去其毒性成分並保留其有效成分，或將有毒成分經炮製後轉變成毒性低或無毒性成分，將可增加神農本草經下品藥之臨床可用率。
2. 宜將臨床常用之下品藥以本研究之急性毒性試驗先評估其急性半數致死劑量（LD_{50}），再以一般常用劑量為基礎進行28天亞急性毒性，以探討其無毒性劑量及致死劑量，並進行病理檢驗，若有肝腎毒性，再以肝腎細胞培養以評估其肝腎毒性之機理。

誌　謝

本研究承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(CCMP95-TP-005) 及中國醫藥大學(CMU94-021)之經費補助，特此感謝。

參考文獻

1. 李明亮，2003年全國衛生醫療政策會議總結報告書，國家衛生研究院，2003。
2. 鍍陞東、曹昉睿、雷淑琴，我國1915~1990年中藥不良反應概況，中國中藥雜誌，17:435-438，1992。
3. 袁惠南、譚德講，1992年國內主要醫藥期刊有關中藥不良反應文獻綜述，中國中藥雜誌，18:643-647, 674，1993。
4. 袁惠南、譚德講，1991年國內主要醫藥期刊有關中藥不良反應文獻綜述，中國中藥雜誌，17: 691-698，1992。
5. 袁惠南、譚德講，1990年國內主要醫藥期刊有關中藥不良反應文獻綜述，中國中藥雜誌，16:628-634，1991。

6. 古雲霞、袁惠南，1993，1994年中藥不良反應文獻綜述，中國中藥雜誌，20:502-507，1995。
7. 許冀陝，中藥不良反應，中國藥學雜誌，30:175-176，1995。
8. 李宏、王艷梅，臨床常用中藥的不良反應及預防，中國民間療法，12:64-65，2004。
9. 林向華、周杰華，358例中藥不良反應回顧性分析，中國藥業，13:62-63，2004。
10. 高益民，從龍膽瀉肝丸事件看如何正確對待中藥的不良反應，首都醫藥，6:13-16，2003。
11. 蔡小燕，212例中藥不良反應文獻分析，廣東藥學院學報，20:352-535，2003。
12. 吳春萍，2000年國內主要醫藥期刊報道的中藥不良反應，中國新醫藥雜誌，2:91，2003。
13. 莫斌斌、符成海，260例中藥不良反應文獻分析，中國新藥與臨床雜誌，22:625-626，2003。
14. 蘇世奇、段虞珍，中藥不良反應文獻調查分析，中國現代醫學雜誌，12:72-73，2002。
15. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. Lancet, 341:387-391, 1993.
16. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. Lancet, 343:174, 1994.
17. Chan TY, Chan JC, Tomlinson B, Critchley JA. Chinese herbal medicines revisited: A Hong Kong perspective. Lancet, 342:1532-1534, 1993.
18. Keeler RF, Tu AT. Vol. 1. Plant and Fungal Toxins. In: Handbook of Natural Toxins. Dekker, NY, Keeler RF, Tu AT (eds.), Marcel Dekker, Inc., 1991.
19. 丁濤、黃暉，中草藥不良反應及防治，中國中醫藥出版社，1992。
20. 余朋千、睢文發，中藥的中毒與防治，重慶大學出版社，1993。
21. 陳冀勝、鄭碩，中國有毒植物，科學出版社，1987。
22. 梁華龍，中藥毒副作用及其處理，河南科學技術出版社，1994。
23. 蔣慶雨、齊永茂，中藥不良反應，中國中醫出版社，1995。
24. 徐國鈞、陳金泉，香港常用有毒中藥圖鑑，商務印書館，1994。
25. 樑慶蓮，雷公藤的不良反應，江西中醫藥，29:54，1998。
26. 黃枝優、趙秀川，馬兜鈴屬植物的腎毒性，時珍國醫國藥，14:248-249，2003。
27. 左建平，馬兜鈴屬植物腎毒性研究進展，中國藥業，12:74-75，2003。
28. 李瑛、曾彩虹，馬兜鈴酸腎毒性作用及其機制研究，腎臟病與透析腎移植雜誌，12：558-563，2003。
29. 陳菊華，從馬兜鈴酸致腎損害談如何避免中藥不良反應，中國藥業，12:64-65，2003。
30. 關小彬，警惕含馬兜鈴酸的中藥引起的腎損害，新醫學，35:305-306，2004。
31. 左巍、馮江敏、王繼紅、王沙西、王力寧、馬建飛、周希靜，中藥馬兜鈴對實驗性大鼠腎損害的研究，遼寧中醫雜誌，30:1027-1029，2003。
32. Litchfield JT, Wilcoxon FA. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96:99-113, 1949.
33. 吳家駒，保健食品之安全性評估，農業生技產業季刊，3:13-18，2005。

34. Frank H, Link B. Anaerobic metabolism of carbon tetrachloride and formation of catabolically resistant phospholipids. Biochem. Pharmacol., 33:1127-1130, 1984.
35. 衛生署，基因毒性試驗(genotoxicity study)：1、微生物基因突變分析--一般使用細菌基因突變測試法(gene mutation in bacteria)。「健康食品安全及功效評估方法」。衛署食字第8803780號，台北，1999。
36. Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol. 1. A. Hollander. Plenum Press, New York and London, pp. 267-282, 1971.
37. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31:347-364, 1975.
38. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 870.5100, EPA 712–C–98–247, Washington, DC, p.13, 1998.
39. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113:173-215, 1983.
40. Organization for Economic Cooperation and Development. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects, No: 471, p. 14, 2001.
41. You BY. Short-term tests for the detection of chemical genotoxicity: I. Salmonella /microsome reversion assay, Ames test. ATD Tech. Bull. No.1, TACTRI. Taichung, p. 15, 1987.
42. Tada H, Shiho O, Kuroshima KI, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin -2. J. Immunol. Meth., 93:157-165, 1986.
43. 唐小江、祝壽芬，山大黃及其多糖的急性毒性和抗突變作用試驗，衛生毒理學雜誌，14:43，2000。
44. 王清秀、吳純啟、廖明陽，大黃及其主要成分的毒性毒理研究，毒理學雜誌，21:301-302，2007。
45. 中醫研究院中藥研究所藥理室、生藥室炮製組，半夏炮製的毒性研究，新醫藥雜誌，1:38-40，1997。
46. 楊守業、葉文華、吳子倫、高曉山，半夏炮製前後對小白鼠急性、亞急性和蓄積性毒性的研究，中成藥，1:18-19，1988。
47. 張風雷、李立紀、吳榮祖、劉培儒，附子、附片及煎煮液化學成分比較實驗及毒性研究，雲南中醫中藥雜誌，25:29-31，2004。

J Chin Med 19(3,4): 93-107, 2008

STUDIES ON COMMON TOXICITY OF CHINESE HERBAL MEDICINES

Wen-Huang Peng[1], I-Shueng Lee[1], Chin-Chuan Tsai[2], Shu-Jen Chang[3], Ming-Tsung Lai[4], Ming-Tsuen Hsieh[1]

[1]Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, China Medical University

[2]Department of Biological Science and Technology, I-Shou University

[3]School of Pharmacy, College of Pharmacy, China Medical University

[4]Department of Pathology, Chang-Bing Show Chwan Memorial Hospital

(Received 03th September 2008, accepted 22th October 2008)

The aims of this study were to investigate the oral 50% lethal toxicity and liver and kidney subacute toxicity for 28 administration of six species of common used Chinese Medicines [Aconiti Radix (AR), Rhei Rhizoma (RR), Pinelliae Rhizoma (PR), Artemisiae Herba (AH), Inulae Flos (IF), Belamcandae Rhizoma (BR)] purchased from three dealer in TCM in mice. We also investigated the anti-mutagenic effect of eight species of common used Chinese Medicines by using the NQNO and B[a]P mutagens to induce mutation in TA98, TA102, TA1535 cell lines (Ames test) and MTT test in HepG2, MDCK and NRK-52E cell lines.

The results shown that the oral LD_{50} of the eight species of common used Chinese Medicines purchased from three dealers in TCM are very low (>10.0 g/kg), except Aconiti radix which the oral LD_{50} was 10.6 g/kg、11.9 g/kg and 9.8 g/kg, respectively. The 28 days feeding toxicity of the eight species of common used Chinese Medicines under the common dosage was very low in mice. However, BR increased the activities of sGOT and sGPT after five times dosage administration for 28 days in mice. Fa-PR increased the sGOT activity after five times dosage administration for 28 days in mice. The morphology of liver tissue produced congestion in central veins, cell enlarge and degeneration. The Fa-PR and Jung-PR increased the BUN level after five times dosage administration for 28 days in mice. The Fa-PR and AH increased the creatinine level after five times dosage administration for 28 days in mice. The morphology of kidney tissue produced congestion, medulla bleeding and degeneration. In the Ames test, the eight species of common used Chinese Medicines did not induce mutation in the TA98, TA100 and TA1535 cell line. RR, AH, IF (1 mg/ml) could induce cell toxicity in HepG2, AH (1 mg/ml) could induce cell toxicity in MDCK, RR, AH, IF, BR (1 mg/ml) could induce cell toxicity in NRK-52E.

These results suggested that the eight species of common used Chinese Medicines possessed low acute toxicity and sub-acute toxicity under clinical dose. The AR, PR, RR, AH, IF and BR possessed non genetic mutation in bacteria. The RR, AH, IF and BR possessed HepG2, MDCK and NRK-52E toxicities. The different results in animal and cell culture may be related to the sensitivity of cell lines

which were selected in this study.

Key words: Chinese medicine, hepatotoxicity, kidney toxicity

Correspondence to: Wen-Huang, Peng, Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University, 91, Hsueh-Shih road, Taichung. Tel: 04-22053366 ext. 5505, Fax: 04-24075683, E-mail: whpeng@mail.cmu.edu.tw